

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Gabriel Agur

Papillide tekkel põhineva testsüsteemi kasutatavus perekond *Pseudomonas* bakterites

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendajad PhD Heili Ilves, MSc Mari Tagel

TARTU 2016

Infoleht

Papillide tekkel põhineva testsüsteemi kasutatavus perekond *Pseudomonas* bakterites

Evolutsiooni paremaks mõistmiseks on oluline kindlaks teha mutatsiooniprotsesse mõjutavad tegurid. Mutatsioonide uurimiseks on meie grupis välja töötatud papillide tekkel põhinev testsüsteem lac-lsc, mida hetkel on kasutatud ainult mullabakteris *Pseudomonas putida* PaW85. Käesolevas bakalaureusetöös selgitatan välja lac-lsc testsüsteemi kasutatavuse erinevates bakteriperekond *Pseudomonas* liikides.

CERCS (B230): Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Märksõnad: Mutatsioonid; perekond *Pseudomonas*; papillid; testsüsteemid; levaan

To better understand evolutionary processes, it is important to find new mutational pathways. For this, our research group has established a novel papillation assay that has been used only in *Pseudomonas putida* PaW85 laboratory strain. In this study I examine the use of this assay in other naturally occurring *Pseudomonas* strains.

CERCS (B230): Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Key words: Mutations; *Pseudomonas* family; papillae, assays; levan

Sisukord

Infoleht	2
Sisukord	3
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1. Mutatsioonid	7
1.1.1. Spontaansed mutatsioonid	7
1.1.2. Indutseeritud mutatsioonid	8
1.2. Reparatsioonimehhanismid.....	9
1.2.1. DNA polümeraasi vigu korrigeeriv aktiivsus	9
1.2.2. MMR – DNA valepaardumiste reparatsioon (ingl k - <i>Mismatch repair</i>).....	9
1.2.3. Oksüdeeritud guaniini reparatsioon (GO)	10
1.2.4. Homoloogiline rekombinatsioon	10
1.2.5. NER (Nukleotiidi väljalõike reparatsioon).....	11
1.3. Statsionaarse faasi mutagenees	11
1.3.1. SOS vastus	12
1.4. Testsüsteemid mutatsioonide tuvastamiseks bakterites	12
1.4.1. <i>Escherichia coli</i> testsüsteemid	13
1.4.1.1. Aminohapete auktroofsusel põhinevad testsüsteemid	13
1.4.1.2. Lac ⁺ papillide tekkel põhinev testsüsteem (Lac).....	13
1.4.2. <i>Pseudomonas</i> perekonna testsüsteemid.....	14
1.4.2.1. Rifampitsiinil põhinev testsüsteem	15
1.4.2.2. Fenoolil põhinevad testsüsteemid	15
1.4.2.3. Papillide tekkel põhinev testsüsteem lac-lsc	16
2. Eksperimentaalne osa	18
2.1. Töö eesmärk.....	18
2.2. Materjal ja meetodika	19
2.2.1. Töös kasutatud söötmed ja bakterid	19
2.2.2. Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon	19
2.2.3. <i>Pseudomonas</i> 'e tüvede süsinikuallikate kasutatavuse testimine (täpikatse)	20

2.2.4.	Bakterite konjugatsioon (testsüsteemi sisestamine)	20
2.2.5.	Nelikristamise läbinud <i>Pseudomonas</i> tüvede isoleerimine	21
2.2.6.	lac-lsc testsüsteemi funktsionaalsusekontroll	21
2.2.7.	Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	21
2.2.8.	Geelelektroforees	22
2.2.9.	<i>P. Thivervalensis</i> N7 lac-lsc testertüve papillide tekkesageduse hindamine.....	22
2.3.	Tulemused ja arutelu.....	23
2.3.1.	Looduslike ja laboratoorsete mikroobitüvede kollekttsioonist CELMS välja valitud pseudomonaadidel levaani moodustumise ja erinevatel süsinikallikatel kasvu testimine	23
2.3.2.	<i>Pseudomonas`e</i> perekonna levaani mitte moodustavatest liikidest lac-lsc testertüvede konstrueerimine	27
2.3.3.	Konstrueeritud testertüvede kontroll	28
2.3.4.	Levaanipapillide teke <i>Pseudomonas`e</i> perekonna erinevatest liikidest konstrueeritud lac-lsc testertüvedel	30
2.3.5.	Levaanipapilli teket võimaldavate mutantide sageduse võrdlus <i>P. thivervalensis</i> N7 ja <i>P. putida</i> PaW85 lac-lsc testertüvedel	32
	Kokkuvõte	35
	Summary.....	36
	Kasutatud kirjandus	37
	Lisad	41

Kasutatud lühendid

8-oxoG – 8-oksoguaaniin

Amp – ampitsilliin

Chi –ingl k - *crossover hotspot instigator*

dsDNA – kaheaheelaline DNA

Gm – gentamütsiin

GO – oksüdeeritud guaniin (*7,8-dihydro-8-oxoguanine*)

Km – kanamütsiin

Lac – laktoos

LB – Luria-Bertani sööde

MMR – DNA paardumisvigade reparatsioon (ingl k – *mismatch repair*)

NER - nukleotiidi väljalõike reparatsioon (ingl k – *nucleotide excision repair*)

phe – fenool (ingl k – *phenol*)

Pol – polümeraas

Rif – rifampitsiin

ROS – reaktiivsed hapniku ühendid (ingl k – *reactive oxygen species*)

ssDNA – üheaheelaline DNA

UV-kiirgus – ultraviolett kiirgus

CELMS – mittemeditiinilise päritoluga looduslike ja laboratoorsete mikroobitüvede kollektsioon
(*Collection of environmental and laboratory microbial strains*)

Sissejuhatus

Mutatsioonid on muutused DNA nukleotiidses järjestuses, millest lähtuv geneetiline mitmekesisus on aluseks evolutsioonile. Mutatsioonid võivad tekkida nii mutageensete kemikaalide, kiirguste kui ka DNA sünteesil tekkivate vigade tulemusel. Enamik mutatsioone on tavaliselt rakkudele kahjulikud ning seetõttu on geneetilise materjali terviklikkuse tagamiseks rakkudes mitmeid erinevaid DNA kahjustusi ära hoidvaid või parandavaid süsteeme.

Mutatsioonide uurimiseks on bakteritele välja töötatud erinevaid testsüsteeme, mis võimaldavad jälgida mutatsioonide tekkimist, arvutada mutatsioonisagedusi ning koos teiste metoodikatega kombineerituna avastada mutatsioonide teket mõjutavaid geene. Kuna *Escherichia coli* on olnud läbi aegade kõige levinumaks mudelorganismiks, siis on just enterobakteritele loodud rohkelt testsüsteeme, mis põhinevad nii aminohapete auksotroofsusel kui ka laktoosi kasutusel. Küll aga ei pruugi *E. coli* jaoks loodud testsüsteemid sobida teistes gramnegatiivsetes bakterites kasutamiseks, näiteks pole laktoosil põhinevad testsüsteemid rakendatavad *Pseudomonas* perekonna bakterites, kellel puuduvad laktoosi lagundamiseks vajalikud geenid.

Meie laboris uuritakse mutatsiooniprotsesse mullabakteris *Pseudomonas putida* PaW85. Mutatsioonide uurimiseks töötati hiljuti välja uudne papillide tekkel põhinev testsüsteem lac-lsc, mille kasutatavust on siiani näidatud ainult laboritüves *P. putida* PaW85. Vastav testsüsteem võimaldab jälgida üksikkolooniate tasemel mutatsioonide toimumist ning seetõttu kasutati seda testsüsteemi *P. putida* PaW85 genoomist mutatsioonisagedust mõjutavate geenide otsimiseks (Tagel jt., 2016). Selle bakalaureusetöö eesmärgiks on välja selgitada lac-lsc testsüsteemi kasutatavus teistes *Pseudomonas* perekonna bakterites.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Mutatsioonid

Mutatsioonid on püsivad, edasikanduvad muutused organismi genoomses järjestuses ning on peamiseks geneetilise varieeruvuse tekitajaks. Geneetiline varieeruvus omakorda on aluseks looduslikule valikule, võimaldades kohasemate variantide tekkimist (Sniegowski jt., 2000). Üldiselt on enamik fenotüübilisi muutusi põhjustavaid mutatsioone organismile kahjulikud. Seetõttu on nii eukariootides kui ka prokariootides olemas genoomi terviklikkuse tagamiseks reparatsioonimehhanismid, mis eemaldavad DNA kahjustuse kohe pärast selle tekkimist. Kui aga DNA kahjustust ei parandata, siis genoomi replikatsioonil toimub mutatsiooni kinnistumine (Sniegowski jt., 2000, Krwawicz jt., 2007). Mutatsioonid jagatakse tekkemehhanismi alusel kaheks: spontaanseteks ja indutseerituteks.

1.1.1. Spontaansed mutatsioonid

Spontaansed mutatsioonid ehk iseeneslikud mutatsioonid tekivad välise mutageeni puudumisel, raku elutegevuse käigus (Rosche ja Foster, 2000). Üheks spontaansete mutatsioonide tekitajatateks on reaktiivsed hapnikuühendid (ROS; ingl k – *reactive oxygen species*), nagu näiteks vesinikperoksiid (H_2O_2) või hüdroksüülradikaal ($\cdot OH$). Sellised radikaalid tekivad aeroobse hingamiseahela reaktsioonide käigus ning need võivad inaktiveerida valke või kahjustada DNA lämmastikaluseid (Messner ja Imlay, 2002). Nitraadi redutseerimisel nitritiks tekivad reaktiivsed lämmastikühendid, mis on võimelised lisama metüül- või etüülrühma G või A nukleotiidile. Sellised alküülkahjustused soodustavad DNA lämmastikaluste valesipaariumist (Shrivastav jt., 2010). Kasvavas bakterikultuuris on oluliseks mutatsioonide allikaks ka DNA polümeraasi vead (Rosche ja Foster, 2000). Tavaliselt tekib bakteritel DNA sünteesi ajal vigu harva. Üldiselt on mõõdetud DNA polümeraasil veasageduseks $10^{-10} - 10^{-9}$ viga replitseeritud aluspaari kohta (Bridges, 2001).

DNA polümeraasi vead replikatsioonil:

- Raaminihke mutatsioonid - insertsoonide või deletsioonide (nukleotiidi lisamine või kadumine DNA replikatsioonil) kaudu tekivad genoomis raaminihke mutatsioonid, mille tulemusel nihkub lugemisraam nukleotiidi võrra edasi või tagasi ning ei kodeerita enam funktsionaalset valku.
- Transversioonid tekivad siis kui DNA polümeraas asendab puriini (A, G) pürimidiiniga (T, C) või vastupidi. Kui viga ära ei parandata, kinnistub järgmise replikatsioonitsükliga punktmutatsioon.
- Transitsioonid tekivad kui DNA polümeraas asendab puriini teise puriiniga või pürimidiini teise pürimidiiniga. Selle vea tulemuseks on samuti punktmutatsioon.

1.1.2. Indutseeritud mutatsioonid

Erinevad keskkonnas leiduvad kemikaalid või kiirgused võivad kahjustada nukleotiidset järjestust, põhjustades mutatsioone. Neid DNA kahjustusi, mis on põhjustatud rakuvälise teguri poolt, nimetatakse indutseeritud mutatsioonideks. Üks tuntumaid mutageensete kemikaalide gruppe on alküülivad ühendid. Selle rühma ühendid reageerivad rakkudes DNA lämmastikalustega, põhjustades nii asendusmutatsioone või tekitades DNA ahelate vahele replikatsiooni peatavaid ristsidemeid. Tuntuimateks alküülivateks ühenditeks on metüülnitrosourea (MNU), metüülmetaansulfonaat (MMS) ning mitomütsiin C (MMC). Neid ühendeid leidub keskkonnas ning on laialdaselt kasutatud ühendid mutageneesi- ja SOS vastuse uuringute läbiviimisel (Tomasz, 1995, Shrivastav jt., 2010). Lisaks võivad mutatsioonide teket põhjustada reaktiivsed lämmastikuühendid nagu lämmastikoksiid ($\text{NO}\cdot$) ning lämmastikushape (HNO_2). Nende ühendite oksüdatsiooniproduktid on väga reaktiivsed ning põhjustavad DNA oksüdeerimist ja deamiinimist (Caulfield jt., 1998).

DNA-d võivad ka kahjustada radioaktiivsed kiired. Ioniseeriv kiirgus võib mõjuda DNA-le nii otseselt kui ka kaudselt. Kui ioniseeriv kiirgus neeldub otse DNA-s, ioniseeritakse suhkruid või lämmastikaluseid, mis tekitavad DNA ahelatesse katkeid. Samuti võivad ioniseeruda vee molekulid, mille tulemusel tekivad reaktiivsed hapniku ühendid, mis annavad alust mutageneesile (Wood jt., 1990). UV-kiirgus võib luua kovalentseid ristsidemeid üksteise kõrval asetsevate pürimidiinide (enamasti T-T ja T-C) vahel. Tavaliseks selliseks kahjustuseks on tsüklobutaan

pürimidiini dimeerid, mis peatavad DNA replikatsiooni ning kui seda viga ei parandata inhibeerib see bakteri elutegevust. (Witkin, 1976).

1.2. Reparatsioonimehhanismid

Fenotüüpi mõjutavad mutatsioonid on tavaliselt organismidele kahjulikud (Sniegowski jt., 2000). Genoomi terviklikkuse säilitamiseks on organismides mitmeid erinevaid DNA kahjustusi ära hoidvaid või parandavaid süsteeme (Krwawicz jt., 2007). Järgnevalt kirjeldangi bakterite põhilisi reparatsioonimehhanisme, mis taastavad korrektse DNA järjestuse ning seeläbi aitavad ära hoida mutatsioonide kinnistumist.

1.2.1. DNA polümeraasi vigu korrigeeriv aktiivsus

DNA sünteesi käigus tekkivate vigade parandamiseks on *E. coli* puhul DNA polümeraasidel I, II ja III olemas 5'-3' eksonuleaasne aktiivsus (*proofreading*), mis valesti sisse lülitatud nukleotiidi välja löikab. *E. coli* DNA polümeraas III näitel vastutab vea ära tundmise eest polümeraasi epsilon subühik, mida kodeerib *dnaQ* geen (tihti tuntud ka kui *mutD*). *E. coli* tüvedel millel *mutD* on defektne, esineb palju replikatsioonivigu ja on kõrgenenud mutatsioonisagedusega (Echols jt., 1983, Miller, 1996). Eksperimentaalsed tööd on näidanud, et kuni 92% replikatsiooni käigus valesti sisse lülitatud nukleotiididest parandab ära replikatiivse DNA polümeraas III-e epsilon subühik (Bloom jt., 1997).

1.2.2. MMR – DNA valepaardumiste reparatsioon (ingl k - *Mismatch repair*)

DNA valepaardumiste reparatsioonirada ehk MMR on reparatsioonisüsteem, mida bakterid kasutavad replikatsioonil valesti paardunud nukleotiidide välja vahetamiseks õige vastu. See reparatsioonisüsteem koosneb mitmetest valkudest ning tegutseb eraldiseisvalt DNA polümeraasist, otsides vigu just sünteesitud kaheaheelaliselt DNA-lt (Harfe ja Jinks-Robertson, 2000). *E. coli* bakterites tuntakse ära uus ja vana ahel metüülatsiooni mustri abil, kus värskelt sünteesitud DNA-l üks ahelatest pole veel metüleeritud, ehk DNA on hemimetüleeritud olekus. MMR tunneb ära metüleerimata ahela kui uue ja eemaldab valepaardunud nukleotiidi just sellelt ahelalt. *E. coli* näitel on MMR-i valgud MutH, MutL, MutS ja helikaas UvrD. MutS tunneb ära valesti paardunud nukleotiidi ning kinnitub sellele. Seejärel MutL aktiveerib MutH eksonukleaasse

aktiivsuse, mis ATP vahendusel vale nukleotiidi uuest ahelast välja lõikab. Mutandid kellel puudub või on muteerunud kas või üks MMR raja geen, on tugeva mutaatorfenotüübiga (suurenenud mutatsioonisagedus) ning mutatsioonide parandamine tugevalt häiritud (Miller, 1996).

1.2.3. Oksüdeeritud guaniini reparatsioon (GO)

Aeroobse metabolismi tagajärjel tekib rakkudes palju reaktiivseid hapnikuühendeid, mis oma reaktiivsuse tõttu on võimelised tekitama DNA-s hulgaliselt kahjustusi. Üheks sagedasemaks kahjustuseks on guaniini oksüdatsiooniprodukt 8-oxoG (8-hüdroksüguaniin; GO). Selline oksüdeeritud guaniini molekul on võimeline paarduma nii tsütosiini kui ka adeniiniga, viimasega paardudes tekib DNA ahelasse trasversioon (Kamiya, 2003). Selliste mutatsioonide ära hoidmiseks kasutavad bakterid oksüdeeritud guaniini reparatsioonis osalevaid MutT, MutM ja MutY valke. MutT hüdrolyüsib 8-oxodGTP 8-oxodGMP-ks, mis ei ole enam mutageense efektiga. MutM glükosülaas eemaldab 8-oxoG DNA ahelast ning MutY glükosülaas eemaldab 8-oxoG-ga paardunud adeniiniga (Michaels ja Miller, 1992).

1.2.4. Homoloogiline rekombinatsioon

Homoloogilise rekombinatsiooni mehhanismi kasutavad nii bakterid kui ka kõrgemad organismid DNA replikatsiooni peatavate mutatsioonide parandamiseks. Homoloogiline rekombinatsioon on protsess, mille kaudu vahetatakse sarnaseid järjestusi kahe sama või erineva DNA molekulide vahel, võimaldades bakteritel väga edukalt parandada ssDNA või dsDNA katkeid (Court jt., 2002). *E. coli* puhul kasutatakse katkete parandamiseks RecBCD ja RecFOR rekombinatsiooniradasid, kus RecBCD alustab rekombinatsiooni dsDNA katkelt ning RecFOR ssDNA katkelt (Rocha jt., 2005).

- RecBCD rekombinatsioonirada

RecBCD on multifunktsionaalne valkkompleks, mis vastutab DNA degradeerimise, lahti keeramise, skanneerimise ja RecA valgu kaasamise eest. RecBCD kompleks seondub dsDNA katkele ning hakkab mõlemat ahelat degradeerima kuni *chi* (ingl k - *crossover hotspot instigator*) järjestuseni. Pärast *chi* järjestusega kokku puutumist lagundatakse edasi ainult ühte ahelat ning keeratakse ahelat lahti eesolev dsDNA. Allesjäävale ssDNA-le seondub RecA valk, mis

homoloogilise piirkonna leidmisel viib läbi ahelate vahetuse ning võimaldab moodustada „Holliday“ struktuuri. „Holliday“ struktuuri liikumise ja lagunemise eest vastutavad RuvABC valgud, mille tulemusel moodustuvad rekombinantsed DNA ahelad (heterodupleksid). Rekombinatsiooni protsessil tekkinud tühimikud sünteesib täis DNA polümeraas ning otsad ühendab ligaas (Cox jt., 2000).

- RecFOR rekombinatsioonirada

RecFOR rajas seondvad ssDNA katkele RecQ ja RecJ valgud, kus RecQ käitub kui helikaas ning RecJ degradeerib ühte ahelat kuni *chi* järjestuseni. Pärast seda saavad seonduda RecF, RecO ja RecR valgud, mis aitavad RecA-l DNA-le seonduda ning seejärel saab toimuda sarnane protsess nagu RecBCD rajas (Nowosielska, 2007).

1.2.5. NER (Nukleotiidi väljalõike reparatsioon)

Nukleotiidi väljalõike reparatsioon (ingl k – *nucleotide excision repair*, NER) eemaldab genoomist DNA ahelat moonutavaid kahjustusi, lõigates vastavast piirkonnast välja DNA fragmendi koos kahjustada saanud nukleotiidiga. NER on võimeline ära tundma nii UV-kiirguse tagajärjel tekkinud tsüklobutaani pürimidiini dimeere kui ka 6-4 UV fotoprodukte, mis põhjustavad nukleotiidide vahel konformatsioonilisi muutusi. Kahjustunud nukleotiidide väljalõikamist teostab bakterites UvrABC süsteem (Van Houten, 1990, Truglio jt., 2006). *E. coli* näitel koosneb NER UvrA, UvrB, UvrC ja UvrD valkudest. Protsess algab UvrA dimeeri seondumisega UvrB-le, mis seejärel seondub kompleksina DNA-le. UvrAB kompleks otsib seejärel vale konformatsiooniga DNA-d, mille leidmisel UvrA dimeer lahkub ning seondub UvrC. Allesolev UvrBC kompleks tekitab mõlemale poole kahjustunud nukleotiidist ssDNA katked, kus eemaldatakse kuni 12 nt pikkune DNA segment. UvrD helikaas harutab DNA lahti ning tühimiku täidab ära DNA pol I ning DNA ligaas ligeerib otsad kokku (Batty ja Wood, 2000).

1.3. Statsionaarse faasi mutagenees

Looduses on bakterid pidevalt silmitsi erinevate stressi tekitavate faktoritega nagu nälg, temperatuuri ja pH kõikumised ning toksiliste ainete olemasolu kasvukeskkonnas. Sellistel tingimustel on bakterite kasv aeglustunud või peatunud ning bakterikultuur on sisenenud

statsionaarsesse faasi. Kuigi ebasobivad kasvutingimused vähendavad bakterites DNA replikatsiooni, on stressitingimustes oluliselt suurenenud mutatsioonide tekkesagedus. Mutatsioonisageduse suurenemine bakteripopulatsioonis võimaldab kohasemate variantide tekkimist ning stressitingimustes ellujäämist. Seda protsessi nimetatakse nii adaptiivseks- kui ka statsionaarse-faasi mutageneesiks (Kivisaar, 2010, Rosenberg jt., 2012).

1.3.1. SOS vastus

Stressitingimuste üle elamiseks on bakterites välja kujunenud rakutsükli aeglustav ning DNA reparaatsiooni esile kutsuv SOS vastus. SOS vastus kutsutakse tavaliselt esile kui DNA replikatsioon on peatunud või DNA-sse on tekkinud ssDNA katke, mis omakorda tihti kutsub esile replikatsioonikahvli peatumise. Katke tagajärjel seondub ssDNA-le RecA valk ning ssDNA-RecA kompleks vallandab LexA autoproteolüüsi. LexA on SOS vastuse repressor ning selle lagunemisel saab SOS reguloni geenidelt alata transkriptsioon. On täheldatud, et *E. coli* SOS reguloni kuulub umbkaudu 30 geeni, sh näiteks DNA kahjustuste parandamises osalevaid valke kodeerivad *recN*, *umuDC*, *ruvA* geenid ning vigu tegevat DNA pol IV kodeeriv *dinB* geen (Lusetti ja Cox, 2002, Wade jt., 2005, Foster, 2007). SOS vastusest tingitud suurenenud mutatsioonisagedus on seotud vigu tegevate DNA polümeraaside (Pol IV, Pol V) kaasamisega DNA sünteesi. Nendel polümeraasidel puudub 5'-3' eksonukleaaasne aktiivsus, mille tulemusel valesti DNA ahelasse lülitatud nukleotiidid ei eemaldata. Selline vigaderohke DNA süntees tõstab geneetilist varieeruvust ning seega ka kohanemise võimalust stressitingimuste ajal (Rosenberg jt., 2012, Williams ja Foster, 2012).

1.4. Testsüsteemid mutatsioonide tuvastamiseks bakterites

Mutatsiooniprotsesside uurimiseks bakterites on välja töötatud mitmeid testsüsteeme, mis võimaldavad tuvastada bakteripopulatsioonis mutatsioonide tekkimist ja välja arvutada mutatsioonide tekkesagedust. Kuna *Escherichia coli* on bakterite seas kõige levinumaks mudelorganismiks, siis on eelkõige just sellele liigile loodud arvukalt testsüsteeme mutatsiooniprotsesside uurimiseks. Järgnevalt kirjeldan *E. coli* testsüsteeme, mis põhinevad aminohapete auksotroofsusel ja laktoosi kasutusele võtmisel ning meie laboris kasutusel olevaid testsüsteeme *Pseudomonas* perekonna mutatsioonide uurimiseks.

1.4.1. *Escherichia coli* testsüsteemid

1.4.1.1. Aminohapete auksotroofsusel põhinevad testsüsteemid

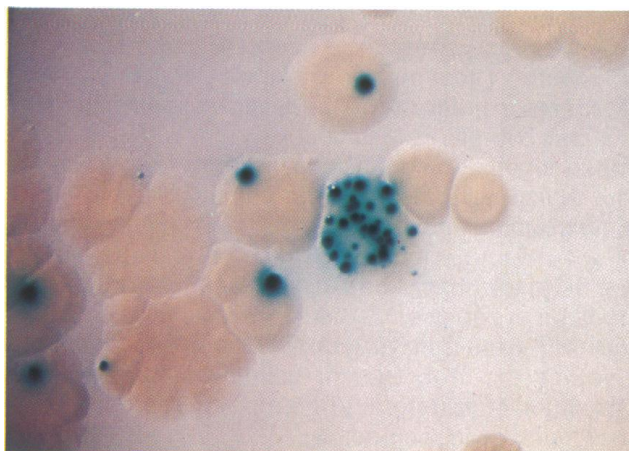
Aminohapete auksotroofsusel põhinevad testsüsteemid töötavad sarnasel põhimõttel. Aminohapete biosünteesi radade võtmeensüümi geenidesse on sisse viidud mutatsioon, mille tagajärjel vastav *E. coli* tüvi ei suuda enam seda aminohapet ise sünteesida. Juhul kui genoomis tekib mutatsioon, mis taastab vastava aminohappe sünteesiraja võtmeensüümi funktsionaalsuse, siis sellised prototroofsed revertandid suudavad taas ise sünteesida konkreetset aminohapet ja kasvada minimaalsöötmel, kus seda aminohapet pole. Tuntuimad aminohapetel põhinevad testsüsteemid kasutavad peamiselt vigaste arginiini, trüptofaani ja türosiini biosünteesiraja võtmeensüümide geenide reverteerumist funktsionaalseteks.

Näiteks *E. coli* kromosoomis paiknev *argE3* geen kodeerib N^a -atsetüül-L-ornitiini deatsetülaasi. See ensüüm on oluline arginiini biosünteesiks ning testsüsteemis kasutatavas *E. coli* tüves on *argE3* geeni sisse viidud enneaegne stop-koodon, mille tagajärjel lõppeb translatsioon enneaegselt ning funktsionaalset ArgE3 valku ei sünteesita. Arg^+ fenotüüp taastub punktmutatsiooniga *argE3* geeni UAA koodonis ning sellised tüved suudavad taas ise arginiini toota. Arg^+ revertandid võivad tekkida nii spontaansete kui ka indutseeritud mutatsioonide kaudu (Sledziewska-Gojska jt., 1992). Sarnaselt arg^+ reverteerumisel põhinevale testsüsteemile on ka trp^+ ja tyr^+ reverteerumisel põhinevad testsüsteemid seotud aminohapete biosünteesi geenidega. *trpE65* geen kodeerib trüptofaani ning *tyrA14* türosiini biosünteesi eest vastutavat ensüümi ning nende geenidesse on samuti viidud enneaegne stop-koodon. Erinevuseks arginiinil põhineva testsüsteemiga on selles, et kasutatakse teisi aminohappeid ning samuti *E. coli* tüved on erinevad (Ohta jt., 2002).

1.4.1.2. Lac^+ papillide tekkel põhinev testsüsteem (Lac)

Papillide teke on protsess, kus mutatsioonide tagajärjel tekivad rakukolooniate pinnale uued mikrokolooniad, kellel on tekkinud võime omastada kasvukeskkonnas leiduvat uut süsinikuallikat ja seeläbi jätkata kasvu (Yang jt., 2011). *E. coli* Lac testsüsteemis on laktoosi lagundamiseks vajalik *lacZ* geen muudetud mittefunktsionaalseks kas raaminihkega või punktmutatsiooniga *lacZ* geeni positsioonis 461 (β -galaktosidaasi aktiivtsenter). *lacZ* on β -galaktosidaasi kodeeriv geen, mis paikneb laktoosi operonis ning mille ekspressioon lubab kasutada laktoosi või selle kunstlikku

analoogi P-gal-i süsinikullikana. Lac testüsteemi kasutamiseks plaaditakse *E. coli* rakud kahte süsinikuallikat sisaldavale söötmele. Primaarne süsinikuallikas (glükoos) võimaldab kolooniate moodustumist ning juhul kui mutatsioonide toime aktiveeritakse β -galaktosidaasi kodeeriv geen *lacZ*, saavad rakud kasutada sekundaarset süsinikuallikat laktoosi ja moodustada Lac⁺ papille kolooniate pinnale. Laktoosi kasutusele võtmise tulemusel ning X-gal-i söötmesse lisamisel tekib *E. coli* kolooniate pinnale sinaka värvusega Lac⁺ revertantsed mikrokolooniad ehk papillid (Joonis 1). Papillide tekke abil on võimalik märgata mutatsioone üksikutes kolooniates ning identifitseerida erinevaid mutatsioonide tüüpe. (Cupples ja Miller, 1989, Peix jt., 2009).



Joonis 1. Lac⁺ papillide teke *E. coli* kolooniatel. Söötmele on lisatud X-gal, P-gal ja glükoos. Kolooniate pinnale on tekkinud sinised papillid ehk Lac⁺ revertandid, mis on mutatsioonide tulemusel suutnud lagundama hakata laktoosi analoogi P-gal-i (Cupples ja Miller, 1989).

1.4.2. *Pseudomonas* perekonna testsüsteemid

Perekond *Pseudomonas* on tuntud kui lai grupp baktereid, kes elavad mullas, vees, taimedes ning loomades. Nad on võimelised lagundama erinevaid kahjulikke mürgiseid aineid, orgaanilisi ühendeid ning antibiootikume, mida keskkonnas leidub. Selle tõttu on nad ka väga olulised mikroorganismid mulla mikroobikoosluse loomisel ning jäätmete lagundamisel (Peix jt., 2009). Mutatsioonide uurimiseks pseudomonaadides on meie laboris konstrueeritud ja kasutatud mitmeid testsüsteeme (Kasak jt., 1997, Tegova jt., 2004, Jatsenko jt., 2010, Juurik jt., 2012) ning järgnevalt tutvustan neid ka lühidalt.

1.4.2.1. Rifampitsiinil põhinev testsüsteem

Rifampitsiin (Rif) on antibiootikum, mis seondub RNA polümeraasi β subühikuga ning takistab bakterirakkudes transkriptsiooni toimumist. RNA polümeraasi β subühikut kodeerivas geenis (*rpoB*) toimuvad mutatsioonid viivad rifampitsiini resistentsete mutantide tekkeni. Kui *rpoB* geenis tekkivad mutatsioonid modifitseerivad RNA polümeraasi molekulis rifampitsiini seondumissaiti, ei suuda Rif enam sinna seonduda ning sellised mutandid suudavad kasvada Rif-il. Rif-il põhinevat testsüsteemi kasutatakse paljude mikroobiperekondade mutatsioonisageduste uuringute läbiviimiseks, kus Rif^r mutantide arvu põhjal tehakse järeltõlge kindla bakteritüve üldisest mutatsioonide tekkemääradest. Samas tuleb arvestada sellega, et Rif-il saab ainult loendada mutante, mis on tekkinud enne plaatimist ehk kasvavas rakukultuuris. See on aga selle tõttu, et Rif-i testsüsteem põhineb letaalsel selektsioonil ning muteerumata *rpoB* geeniga bakterid sellel antibiootikumil ellu ei jää (Campbell jt., 2001, Jatsenko jt., 2010). Meie laboris on Rif-il põhinevat testsüsteemi kasutatud näiteks *P. putida* PaW85 GO reparatsioonirajas osaleva MutY uurimisel (Saumaa jt., 2002)

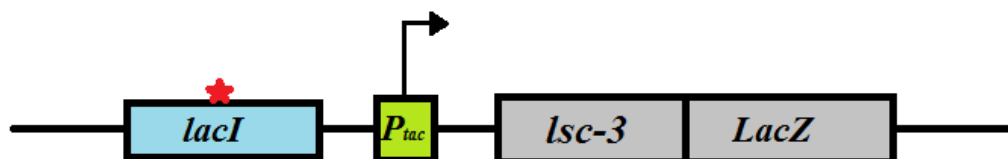
1.4.2.2. Fenoolil põhinevad testsüsteemid

Mutatsioonide uurimiseks *P. putida* rakkudes on meie laboris konstrueeritud nii plasmiidseid kui ka kromosomaalseid fenooli kasutuselevõtul põhinevaid testsüsteeme. Mõlemad testsüsteemid lubavad mutatsioonide tagajärjel kasutada fenooli ainsa süsinikuallikana. Plasmiidset testsüsteemi (näiteks pKTpheA56+A ja pKTpheA22TAG) on näiteks kasutatud statsionaarse faasi *P. putida* PaW85-e tüves raaminihete ja punktmutatsioonide tuvastamiseks. Nendes testsüsteemides on fenooli monooksügenaasi geen (*pheA*) rikitud kas raaminihkega või enneaegse stop-koodoniga. Neid parandavad mutatsioonid taastavad *pheA* geeni ning seeläbi fenooli monooksügenaasi ekspressiooni, mis võimaldab vastavatel *P. putida* PaW85 rakkudel hakata kasvama fenooli ainsa süsinikuallikana sisaldavatel tassidel (Tegova jt., 2004). Kuna plasmiidne replikatsioon erineb siiski kromosomaalsest replikatsioonist, siis loodi meie laboris mutatsioonide uurimiseks ka kromosomaalne fenooli kasutusel põhinev testsüsteem, millega saab detekteerida erinevaid mutatsioonitüüpe (asendusmutatsioone, insertsioone, deletsioone). See testsüsteem koosneb minitransposoon Tn5 abil *P. putida* PaW85 kromosoomi suvalisse regiooni viidavast *lacI*-P_{tac}*pheBA* geenikassetist, kus fenooli lagundamiseks vajalikud geenid (*pheBA*) on viidud *lacI* repressori ja P_{tac} promootori kontrolli alla. Mutatsioonid, mis inaktiveerivad LacI repressori või

toimuvad *lac* operaatoralas, võimaldavad rakkudel kasutada süsinikuallikana fenooli (Juurik jt., 2012).

1.4.2.3. Papillide tekkel põhinev testsüsteem lac-lsc

Mutatsioonide uurimiseks ning mutatsioonisagedust mõjutavate geenide otsimiseks mullabakteris *Pseudomonas putida* PaW85, konstrueeriti meie laboris papillide tekkel põhinev testsüsteem lac-lsc. Testsüsteem koosneb *P. putida* PaW85 kromosoomi viidavast *lacI*- P_{tac} -*lsc-3*-*lacZ* geenikassetist, kus sahharoosi lagundamiseks vajalik geen (*lsc-3*) ja β -galaktosidaasi kodeeriv geen (*lacZ*) on LacI repressori ja P_{tac} promootori kontrolli all. See testsüsteem põhineb LacI repressori mutatsioonilisel inaktiveerimisel, mille tulemusel saavad rakud kasutada sahharoosi süsinikuallikana ja samas toota sahharoosi lagundamisel tekkivast fruktoosist kergesti märgatavat rakuvälist polümeeri levaani. Sellised testsüsteemi sisaldavad *P. putida* PaW85 rakud plaaditakse LB tassidele, mis saldavad 10% sahharoosi ja X-gal-i. Tekkivatel kolooniatel jälgitakse 6 päeva vältel levaanipapillide tekkimist koloonia pinnale. *lacI* geenis või *lac* operaatoralas toimuvad mutatsioonid võimaldavad *lsc-3* ja *lacZ* geeni transkriptsiooni ning seeläbi vastavatel rakkudel hakata omastama söötmes olevat sahharoosi (Joonis 2). X-gal-i manulusel värvuvad ka tekkivad papillid sinakalt.

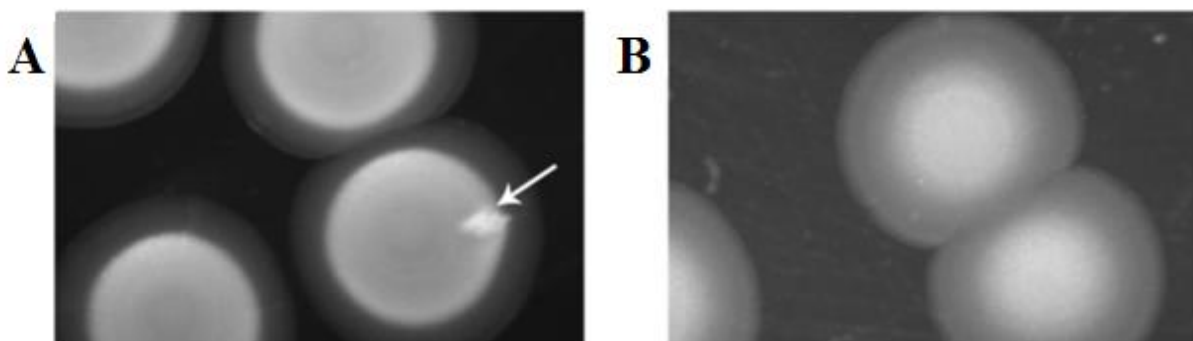


Joonis 2. Testertüve *P.putida* PaW85lac-lsc kromosoomi viidud lac-lsc geenikassett. Punase tärniga märgitud *lacI* geenis toimuva mutatsiooni tulemusel inaktiveeritakse LacI repressor ja avalduvad P_{tac} promootorist allavoolu jäävad geenid *lsc-3* ja *lacZ*. LacI seondumiseks vajalikus *lac* operaatoralas toimuvad mutatsioonid võivad ka põhjustada repressiooni kadumist ning seeläbi lubada *lsc-3* ja *lacZ* geenide transkriptsiooni.

Testsüsteemi lac-lsc sisestamiseks *P. putida* PaW85 kromosoomi on geenikassett viidud kas minitransposoon Tn5 või Tn7 koosseisu. Need minitransposoonid on võimelised koos

geenikassettiga väljuma plasmiidist ning sisenema kromosoomi eri-piirkondadesse. Kui testsüsteem on sisestatud kromosoomi, on transposoonmutageneesi abil võimalik otsida uusi mutatsioonisagedust mõjutavaid geene. Selleks „pommitatakse“ testsüsteemiga tüvesid tühja minitransposoon Tn5-ga, mis siseneb suvalistesse piirkondadesse kromosoomis. Juhul kui selline sisenemine rikub ära mõne rakkudele vajaliku geeni, mis tõstab nendes mutatsioonide tekkimise sagedust, tekib suurema tõenäosusega ka mutatsioone *lacI* geenis. Vastavaid mutatsioone on ka näha rohkete papillide tekkimisega kolooniate pinnale. Meie uurimisgrupis on lac-lsc testsüsteemi abil leitud *P. putida* PaW85 tüves uusi mutatsioonisagedust mõjutavaid geene, millest mõni näiteks osaleb peptidoglükaani biosünteesis, tRNA-de modifitseerimises jne (Tagel jt., 2016).

lac-lsc testsüsteem on analoogne kromosomaalsele fenooli monooksügenaasi geeni (*pheA*) aktivatsioonil põhinevale testsüsteemile, kuid erineb ta selle poolest, et mutatsioonide tulemusel saavad bakterid toota rakuvälist ensüümi levaansukraas. Levaansukraas Lsc3 (sahharoos-6-fruktosüültransferaas) on *lsc-3* geeni kodeeritud rakuväline ensüüm, mis hüdrolyüsib sahharoosi glükoosiks ja fruktoosiks ning polümeriseerib tekkinud fruktoosijäägid levaani polümeeriks. Taimepatogeeni *Pseudomonas syringae* puhul on *lsc* gene kolm (*lsc-1*, *lsc-2* ja *lsc-3*), millest *lsc-3* geeni kodeeritud levaansukraasil on kõrgeim afiinsus sahharoosi suhtes (Alamäe jt., 2012). lac-lsc testsüsteemis tekivad levaansukraasi poolt läbi viidava sahharoosi lagundamise tulemusel kolooniate pinnale uued levaanised mikrokolooniad ehk papillid (Joonis 3).



Joonis 3. Levaanipapillide teke. LacI inaktivatsioonil tekkinud levaanipapill *P. putida* PaW85 lac-lsc testertüve koloonia pinnal (A). Kõrval võrdluseks sama bakteritüve koloonia ilma papillita (B) (Tagel jt., 2016).

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Töö eesmärk

Meie laboris uuritakse mutatsiooniprotsesse mullabakteri *Pseudomonas putida* PaW85 näitel. Mutatsioonide uurimiseks on meie töörühmas konstrueeritud mitmeid plasmiidseid ja kromosoomseid *P. putida* testsüsteeme. Viimati konstrueeriti levaanipapillide tekkel põhinev kromosoomne testsüsteem lac-lsc, mis võimaldab jälgida mutatsioonide toimumist üksikkoloonia tasemel ja otsida *P. putida* PaW85 genoomist mutatsioonisagedust mõjutavaid geene (Tagel jt., 2016). Kuna kromosoomne testsüsteem lac-lsc on hetkel kirjeldatud ja kasutatav ainult *P. putida* PaW85-s, siis tekkis küsimus lac-lsc testsüsteemi rakendatavusest mutatsioonide uurimiseks teistes pseudomonaadides. Sellest lähtuvalt püstitus käesoleva töö eesmärk – selgitada välja papillide tekkel põhineva testsüsteemi lac-lsc kasutatavus ka teistes perekond *Pseudomonas* bakterites.

Töö eesmärgid:

1. Valida looduslike ja laboratoorsete mikroobitüvede kollektsioonist CELMS erinevad levaani mitte moodustavad *Pseudomonas*'e perekonna liigid
2. Konstrueerida erinevatest *Pseudomonas*'e perekonna bakteritest lac-lsc testertüved.
3. Testida levaanipapillide moodustumist *Pseudomonas*'e perekonna erinevatel lac-lsc testertüvedel ja võrrelda papillide tekkesagedusi *Pseudomonas*'e loodusliku- ja laboritüve vahel

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Töös kasutatud söötmed ja bakterid

Baktereid kasvatati LB (*lysogeny broth* ingl k) täissöötmes (1% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl; (Miller, 1972) või M9 minimaalsöötmes (Adams, 1959). M9 minimaalsöötmele lisati mikroelementide lahust (667 μM MgO, 50 μM CaCO₃, 40 μM FeSO₄, 12,5 μM ZnSO₄, 12,5 μM MnSO₄, 2,5 μM CuSO₄, 2,5 μM CoSO₄, 1,9 μM H₃BO₄), süsinikuallikana glükoosi lõppkontsentratsiooniga 0,2%, glükonaati lõppkontsentratsiooniga 0,2%, Na-tsitraati lõppkontsentratsiooniga 0,2%, Suktsinaati lõppkontsentratsiooniga 4 μM , Na-bensoaati lõppkontsentratsiooniga 0,2 % või sahharoosi (suc) lõppkontsentratsiooniga 300 mM. Vajadusel lisati söötmesse X-gal-i lõppkontsentratsiooniga 0,75 mg/ μl ning IPTG-d lõppkontsentratsiooniga 0,5 mM.

Selektsioonimarkerina kasutati antibiootikumi gentamütsiin (Gm 200 $\mu\text{g/ml}$), kanamütsiin (Km; 50 $\mu\text{g/ml}$) või amptitsilliin (Amp; 100 $\mu\text{g/ml}$). *E. coli* rakke kasvatati temperatuuril 37 °C ning *Pseudomonas* perekonna rakke temperatuuril 30 °C. Vedelkultuuride aeratsiooni tagamiseks kasvatati rakukultuure loksutis. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on töötud lisas 1.

2.2.2. Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon

E. coli CC118 λ pir rakke kasvatati üleöö 4 ml-is LB-vedelsöötmes 37°C juures. Kompetentsete rakkude saamiseks lahjendati üleööökultuuri värskesse LB söötmesse tiheduseni 0,1 (OD580) ja kasvatati loksutil tiheduseni 0,9–1,5. Rakud tsentrifuugiti söötimest välja (45–60 sekundit 12100 x g), pesti kaks korda 1 ml destilleeritud veega ja kolm korda 1 ml 10% glütserooliga. Seejärel suspendeeriti rakud 10% glütseroolis ja jaotati mikrotsentrifuugi tuubidesse. Rakke ja töölahuseid hoiti pidevalt jääl.

Plasmiidse DNA viimiseks kompetentsetesse rakkudesse kasutati elektroporatsiooni. Kompetentsetele rakkudele lisati ca 100 ng vees lahustatud plasmiidset DNA-d ning pipeteeriti elektroporatsiooniküveti. Elektroporatsioon viidi läbi “BioRad” elektroporaatoriga “*E. coli* pulser” pingel 2500 V. Rakkudele lisati 1ml LB söödet ja pesti küvetist välja. Seejärel kasvatati rakke tund aega temperatuuril 37 °C ning sellele järgnevalt tsentrifuugiti rakud kokku ja plaaditi selektiivsöötmele.

2.2.3. *Pseudomonas*’e tüvede süsinikuallikate kasutatavuse testimine (täpikatsed)

Looduslike *Pseudomonas*’e tüvede kasvuallikate testimiseks kasutati glükoosi, glükonaadi, Na-bensoaadi, suksinaadi ning tsitraadi minimaalsöötmeid. Kõiki bakteritüvesid eelkasvatati 4 ml LB vedelsöötmes üleöö. Kõikidest tüvedest tehti kuni 10^7 –kordsed lahjenduste read ning igat *Pseudomonas*’e tüve lahjendust tilgutati 10^7 lahjendusest 10 µl kõikidele süsinikuallikatele ning inkubeeriti temperatuuril 30 °C, 2 päeva.

2.2.4. Bakterite konjugatsioon (testsüsteemi sisestamine)

Selleks, et pBKTn7Gm/lsc-3lacZ vektorit sisaldavast *E. coli* CC118λpir tüvest saaks lac-lsc testsüsteemi sisse viia kõikidesse valitud *Pseudomonas*’e tüvedesse, kasutasime konjugatsiooni meetodit nelikristamise põhimõttel. Selleks kasutati järgmiseid bakteritüvesid:

1. *E. coli* CC118λpir [pBKTn7Gm/lsc-3lacZ] ;
2. *E. coli* HB101 [RK2013] ;
3. *E. coli* CC118 λpir [puXBF-13] ;
4. Retsipienttüvi (kas *P. stutzeri* 2A20; *P. stutzeri* 2C63; *P. mendocina* PC1; *P. mendocina* PC5; *P. pseudoalcaligenes* C70; *P. migulae* D67; *P. guinae* 2C3; *P. anguilliseptica* 2Bnah2; *P. corrugata* DSM 7228; *P. fluorescens* PC24; *P. putida* PC39; *P. thivervalensis* N7 või *P. aeruginosa* D10)

E. coli tüvi CC118λpir [pBKTn7Gm/lsc-3lacZ] on lac-lsc geenikassetti doonor. *E. coli* CC118λpir [puXBF-13] helpertüvi on minitransposoon Tn7 transposaasi doonor. *E. coli* HB101 [RK2013] soodustab nelikristamisel piilide moodustumist, mis on vajalik plasmiidide edasikandumiseks retsipienttüvesse (Koch jt., 2001).

Iga konjugatsioonil osalenud tüve kohta tehti eraldi eelkasvatused. *E. coli* puhul kasvatati rakke üleöö 4 ml-s LB söötmes temperatuuril 37 °C ning retsipienttüvede puhul temperatuuril 30 °C vastavate antibiootikumide juuresolekul. Pärast inkubeerimist lahjendati rakukultuure 20 korda 5 ml värskesse antibiootikumita LB söötmesse. Kõik valitud 13 retsipienttüve segati eraldi LB vedelsöötmetes kokku nende kolme *E. coli* tüvega ning ristamissegust pipeteeriti 500 µl LB

tassidele, kus toimus eeldatav testsüsteemiga vektori ülekanne retsipienttütvedesse. Ristamisseguga LB tasse inkubeeriti üleöö 30°C juures.

2.2.5. Nelikristamise läbinud *Pseudomonas* tüvede isoleerimine

Bakteritütvede isoleerimiseks plaaditi kõik konjugatsioonil osalenud bakterid IPTG-d X-Gal-i ja Gm-i sisaldavale minimaalsöötmetega tassidele, kus C-allikaks valiti enamiku pseudomonaadide selektsiooniks glükoos, va *P. guinea* 2C3, *P. anguilliseptica* 2Bnah2 ja *P. pseudoalcaligenes* C70 tüved. *P. guinea* 2C ja *P. anguilliseptica* 2Bnah tüvedel kasutati selektsiooniks tsitraati ning *P. pseudoalcaligenes* C70 tüve selektsiooniks suksinaati. IPTG (isopropüül-β-galaktosiid) lisati söötmesse P_{tac} promootori indutseerimiseks ning X-Gal-i värvusreaktsiooni jaoks. Rakke inkubeeriti 30°C juures 2 päeva. Pärast plaatimist kasvasid nendel minimaalsöötmetel üles ainult *Pseudomonas*'e perekonna tüved ning *E. coli* tüved üles ei kasvanud proliini ja Gm resistentsuse puudumise tõttu. Sellega saime isoleerida võimalikud *Pseudomonas*'e transkonjugandid *E. coli* tüvedest.

2.2.6. lac-lsc testsüsteemi funktsionaalsusekontroll

Testsüsteemi sisenemise kontrollimiseks külvati konjugatsiooni läbinud *Pseudomonas* testertütvede rakud 10% sahharoosi minimaaltassidele, lisades söötmesse Gm-i, Xgal-i ning IPTG-d. Pärast külvamist inkubeeriti rakke üleöö 30°C juures ning seejärel kasvatati rakke toatemperatuuril 2 päeva ning jälgiti levaani tootmist rakkude pinnal.

2.2.7. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-is (ingl k – *Polymerase Chain Reaction*) kasutati sisenenud testsüsteemiga *Pseudomonas*'e tüvede bakterite DNA-d. PCR-i reaktsioonisegu sisaldas 1 x PCR puhvrit, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP-d, 0,5 ühikut Taq polümeraasi ning 10 pmol kahte praimerit uniglSTn7 (5'-AAGTCCAACCTGCAGGAAG-3') ja Tn7r109 (5'-CAGCATAACTGGACTGATTTTCAG-3'), mis seonduvad *glmS* geeni lõpule ning Tn7 minitransposooni otsmistele pöördkordusjärjestustele.

Reaktsioon viidi läbi 25-s tsüklis järgnevatel tingimustel:

1. DNA denaturatsioon 96 °C 30 sekundit,

2. Praimeri seundumine matriitsahelale 54 °C 30 sekundit
3. DNA süntees 72 °C 45 sekundit arvestades Taq DNA polümeraasi sünteesikiirusega 1000 nukleotiidi minutis.

2.2.8. Geelelektroforees

PCR-i produkte analüüsiiti geelelektroforeesil. Selleks lisati 5–7 µl-ile PCR-i produktile foreesivärvi (0,04% broomfenoolsinine 50% glütseroolis). Proovid kanti 1% agarosgeelile 1 x TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2), mis sisaldas etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,33 µg/ml. DNA fragmentide umbkaudse suuruse nägemiseks kasutati firma *Thermo Scientific* DNA markerit. Elektroforees toimus pingel 100–150 volti. DNA visualiseeriti UV valguses.

2.2.9. *P. Thivervalensis* N7 lac-lsc testertüve papillide tekkesageduse hindamine

Papillide tekkesageduse hindamiseks kasutasime *P. thivervalensis* N7 lac-lsc ja *P. putida* PaW85 lac-lsc testertüve. Mõlemad bakteritüved eelkasvatati vedelas LB söötmes üleöö temperatuuril 30°C ning plaaditi kümnele 10% sahharoosiga LB tassidele. Seejärel inkubeeriti rakke temperatuuril 30°C 6 päeva. Esimesel päeval loetleti tekkinud kolooniad ning järgnevatel inkubeerimispäevadel loetleti ka tekkinud papillide arvud. Katset korraldati kolm korda mõlema bakteritüve puhul. Arvutati välja tekkinud papilliga kolooniate protsent.

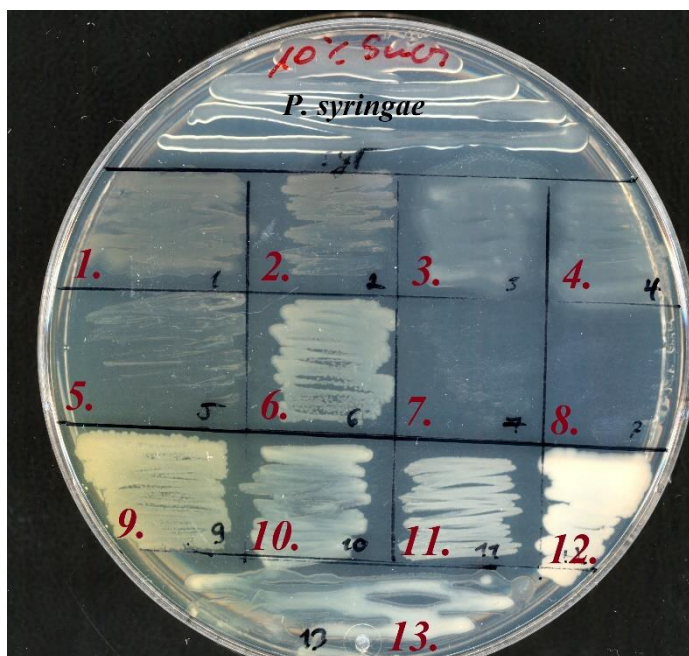
2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Looduslike ja laboratoorsete mikroobitüvede kollekttsioonist CELMS välja valitud pseudomonaadidel levaani moodustumise ja erinevatel süsinikallikatel kasvu testimine

lac-lsc testsüsteemi rakendatavust saab testida vaid levaani mitte moodustavates pseudomonaadides. Selleks, et välja selgitada millised pseudomonaadid levaansukraasi ei kodeeri ja seega ka levaani ei produtseeri, analüüsisin esmalt andmebaasi www.pseudomonas.com (Winsor jt., 2011), mis sisaldab 135 erineva perekond *Pseudomonas* bakteriliigi sekveneeritud genoomi. Joondamisel võtsin aluseks lac-lsc testsüsteemi reportergeeni *lsc-3*, mis pärineb *P. syringae* pv. tomato DC3000 rakkudest. Juba eelnevalt oli kirjanduse põhjal teada (Alamäe jt., 2012), et mitmel perekond *Pseudomonas* liigil on levaansukraase, näiteks *P. fluorescens*, *P. poae*, *P. chlororaphis* ja paljudel *P. syringae* tüvedel. Andmebaasi analüüsist selgus, et sekveneeritud täisgenoomiga pseudomonaadidest puudub levaansukraas *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. corrugata*, *P. putida*, *P. aeruginosa* liikides. Toetudes sellele eelinfole, sain meie instituudi juurde kuuluvast mittemeditiinilise päritoluga looduslike ja laboratoorsete mikroobitüvede kollekttsioonist CELMS (*Collection of environmental and laboratory microbial strains*) järgnevad pseudomonaadid: *P. stutzeri* 2A20, *P. stutzeri* 2C63, *P. mendocina* PC1, *P. mendocina* PC5, *P. corrugata* DSM7228 ja *P. aeruginosa* D10. Lisaks neile sain kollekttsioonist ka teisi perekond *Pseudomonas* liikide tüvesid, mis olid eelnevalt testitud, et nad 5% sahharoosiga LB tassidel levaani ei moodustanud. Nendeks bakteritüvedeks olid: *P. pseudoalcaligenes* C70, *P. migulae* 2C3, *P. guinea* 2C3, *P. anguilliseptica* 2Bnah2, *P. fluorescens* PC24, *P. putida* PC39, *P. thivervalensis* N7

Kuna lac-lsc testsüsteemi katsed *P. putida* PaW85-ga on varasemalt läbi viidud just 10% sahharoosiga tassidel, külvasin kõik CELMS kollekttsioonist saadud pseudomonaadid 10% sahharoosi sisaldavale glükoos minimaaltassile ja jälgisin nädala vältel külvijoone levaaniseks muutumist (Joonis 4). Kontrolliks külvasin kõrvale ka levaani tootva *P. syringae* pv. tomato DC3000 tüve, millega sain võrrelda levaani tootmist või mitte tootmist. Selle katsega sai kindlaks tehtud, et kõik valitud *Pseudomonas*'e liigid on sobilikud kandidaadid testsüsteemi sisestamiseks, kuna ükski neist ei tooda levaani. Külvijoones kasvamiseks kasutasid *Pseudomonas*'e tüved glükoosi, aga huvitaval kombel on jooniselt 4 näha, et *P. guinea* 2C3 ja *P. anguilliseptica* 2Bnah2

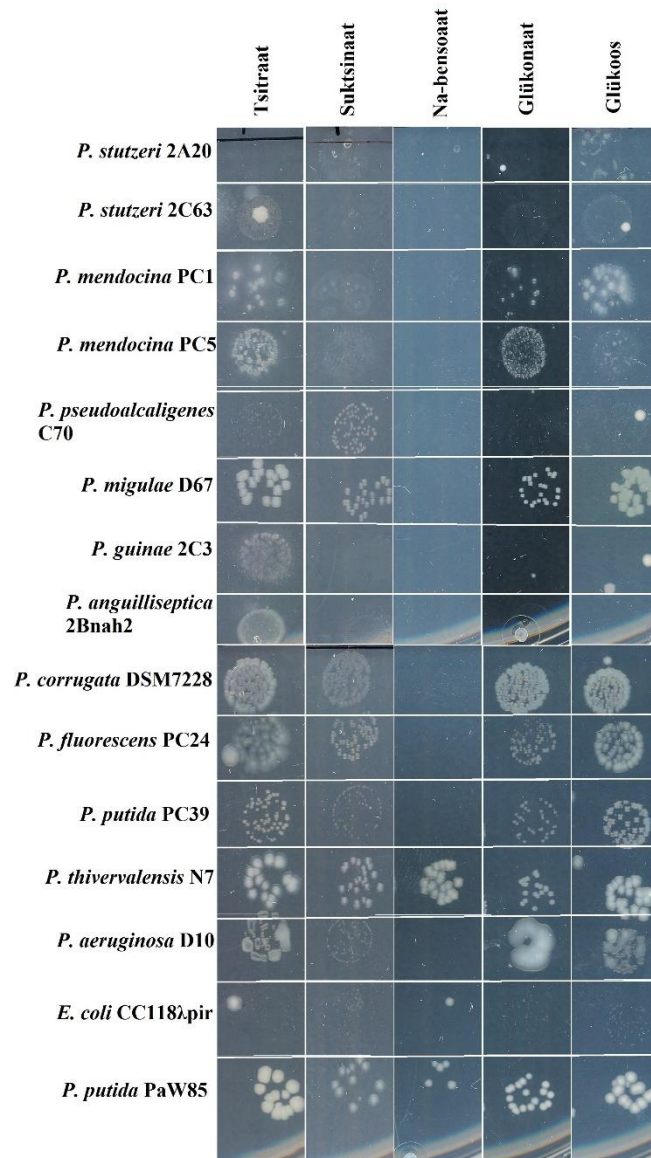
tüved ei kasva hästi glükoos-minimaalsöötmel. See võib tähendada seda, et need kaks tüve ei suuda hästi omastada glükoosi.



Joonis 4. Looduslike pseudomonaadide ja tassi ülemises osas levaani tootva tüve *P. syringae* pv. tomato DC3000 kasv 10% sahharoosi ja 0,2% glükoosi sisaldaval minimaalsöötmel. (1. – *P. stutzeri* 2A20; 2. – *P. stutzeri* 2C63; 3. – *P. mendocina* PC1; 4. – *P. mendocina* PC5; 5. – *P. pseudoalcaligenes* C70; 6. – *P. migulae* 2C3; 7. – *P. guinea* 2C3; 8. – *P. anguilliseptica* 2Bnah2; 9. – *P. corrugata* DSM7228; 10. – *P. fluorescens* PC24; 11. – *P. putida* PC39; 12. – *P. thivervalensis* N7; 13. – *P. aeruginosa* D10)

Kuna plaanisin lac-lsc testsüsteemi viia *Pseudomonas*-e tüvedesse konjugatsiooni teel ning ristamissegust *Pseudomonas*-te transkonjugante välja selekteerida minimaalsöötmel, siis järgnevalt testisin katsesse valitud *Pseudomonas*-te tüvede kasvu erinevate süsinikuallikatega minimaaltassidel. Bakterite ristamisel kasutavad *E. coli* tüved on aminohappe proliini suhtes auksotroofsed ning seetõttu ei suuda kasvada minimaalsöötmetel, kus proliin puudub. Seega tilgutasin nii *Pseudomonas*-te tüvede ning kahe kontrolltüve (*P. putida* PaW85 ja *E. coli* CC118 λ pir) 10^{-7} lahjendustest 10 μ l eraldi viiele minimaaltassile, mis sisaldasid ainsa süsinikuallikana kas glükoosi, glükonaati, Na-bensoaati, suksinaati või tsitraati. Tasse inkubeerisin üleöö temperatuuril 30 °C. Järgmisel päeval selgus millisel süsinikuallikal iga bakteritüvi kõige paremini kasvab ning millise süsinikuallikaga minimaalsöötmetel tuleks järgnevas katses erinevate *Pseudomonas*-e tüve

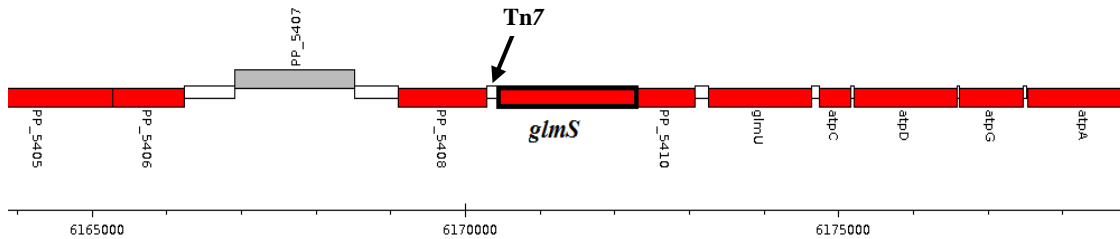
transkonjugante selekteerida. Joonisel 5 on näha, et glükoos-minimaalsöötmetel kasvasid pea kõik *Pseudomonas*'e tüved, välja arvatud *P. guinea* 2C3, *P. anguilliseptica* 2Bnah2 ja *P. pseudoalcaligenes* C70. Seega pole glükoosminimaalsööde sobilik just nendest tüvedest saadud transkonjugantide selektsiooniks. *P. guinea* 2C3 ja *P. anguilliseptica* 2Bnah2 transkonjugantide selektsiooniks oli parem kasutada tsitraati sisaldavat minimaalsöödet ning *P. pseudoalcaligenes* C70 puhul suksinaati sisaldavat minimaalsöödet. Kontrolltüvi *E. coli* CC118 λpir ei kasvanud ühelgi süsinikuallikal (pildil nähtavad üksikud täpid on arvatavasti pipeteerimisel pritsinud mõne teise bakteritüve kolooniad) ning kontrolltüvi *P. putida* PaW85 kasvas kõigil testitud süsinikallikatsisaldavatel minimaalsöötmetel (joonis 5).



Joonis 5. CELMS kolleksioonist valitud pseudomonaadide, *E. coli* CC118 λpir ja *P. putida* PaW85 kasv süsinikallikana tsitraati, suktsinaati, Na-bensoaati, glükonaati või glükoosi sisaldavatel minimaaltassidel. Minimaaltassidele pandi rakkude 10^{-7} lahjendustest 10 µl.

2.3.2. *Pseudomonas*`e perekonna levaani mitte moodustavatest liikidest lac-lsc testertüvede konstrueerimine

CELMS kollektsioonist valitud *Pseudomonas*`e perekonna liikidest lac-lsc testertüvede konstrueerimiseks kasutasin minitransposoon Tn7 põhinevat meetodikat ja meie laboris eelnevalt konstrueeritud plasmidi pBKTn7Gm/lsc-3lacZ, mis sisaldab lac-lsc testsüsteemi gentamütsiini (Gm) resistentsust kandva mini-Tn7 koosseisus. Vastava plasmidi viisin *E. coli* CC118λpir tüvesse elektroporatsiooni meetodil (detailsemalt kirjeldatud peatükis 2.2.2.). Mobiilne DNA element minitransposoon Tn7 transponeerub bakterites kõrgelt konserveerunud *glmS* geeni lõpust 25 nukleotiidi allavoolu paiknevasse mittekodeerivasse DNA regiooni (joonis 6). *glmS* geen kodeerib glükoosamiin-fruktoos-6-fosfaat aminotransferaasi, mis on oluline peptidoglükaani biosünteesis. Seega on mini-Tn7 koosseisus võimalik meid huvitavaid geenikassette viia ühte kindlasse neutraalsesse positsiooni bakterite genoomis. lac-lsc testsüsteemi ja Gm resistentsusgeeni kandva mini-Tn7 plasmidi (pBKTn7Gm/lacItac lsc-3lacZ) viisin konjugatsiooni abil doonortüvest erinevatesse *Pseudomonas*`e perekonna levaani mitte tootvatesse bakteritesse. Konjugatsioon ehk nelikristamine on täpsemalt kirjeldatud peatükis 2.2.3.. Bakterite ristamissegust tegin väljaplaatimised minimaalsöötmetele, mis sisaldasid eelnevalt konkreetse *Pseudomonas*`e tüve jaoks välja valitud süsinikallikat (kas glükoosi, tsitraati või suktsinaati), gentamütsiini ning värvusreaktsiooni jaoks IPTG-d ja X-Gal. Gentamütsiini resistentsetel ja IPTG-X-Gal'i juuresolekul siniselt värvunud transkonjugantidel oli tõenäoliselt lac-lsc testsüsteem edukalt mini-Tn7 koosseisus kromosoomi sisenenud. Selliseid transkonjugante õnnestus isoleerida perekond *Pseudomonas* bakteritest: *Pseudomonas stutzeri* 2C63, *Pseudomonas mendocina* PC1, *Pseudomonas migulae* D67, *Pseudomonas guinae* 2C3, *Pseudomonas anguilliseptica* 2Bnah2, *Pseudomonas corrugata* DSM 7228, *Pseudomonas thivervalensis* N7, *Pseudomonas aeruginosa* D10. Järgnevalt kontrollisin neil tüvedel veel levaani tootmist sahharoosi sisaldavatel söötmetel ning testsüsteemi õiget sisenemist PCR-ga.

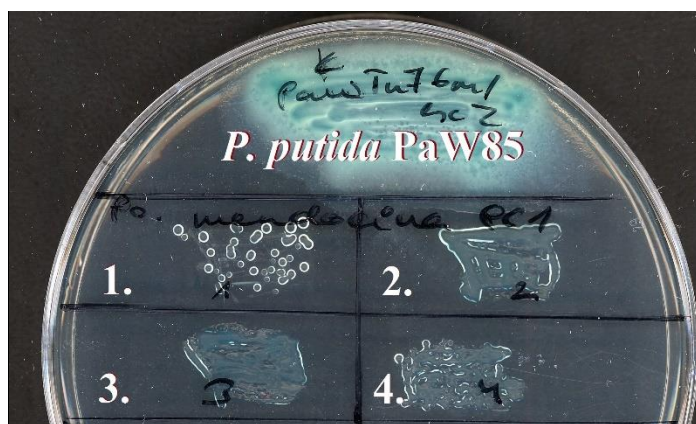


Joonis 6. *Pseudomonas putida* KT2440 genoomis *glmS* geeni (PP_5409) asukoht. Noolega on märgitud minitransposoon Tn7 insertsioonikoht *glmS* geenile järgnevas mittekodeerivas vahealas, mille pikkus on 172 nukleotiidi (www.pseudomonas.com).

2.3.3. Konstrueeritud testertüvede kontroll

Pseudomonas'e perekonna erinevatest liikidest saadud transkonjugante kontrollisin esmalt PCR-ga. Kuna testsüsteemi geenikassetti sisaldav minitransposoon Tn7 peaks paiknema testerüvede kromosoomis *glmS* geenist 25 nukleotiidi allavoolu, siis seepärast kasutasin kontrollimiseks praimereid, millest üks (uniglmSTn7) seondus *glmS* geeni lõppu (suunaga geenist välja) ning teine (Tn7r109) Tn7 minitransposooni otsmisele pöördkordusjärjestusele suunaga transposoonist välja. Kõik analüüsiks valitud transkonjugandid andsid nende praimeritega PCR produkti, mis tähendab, et neis transkonjugantides on testsüsteem õigesse kohta ehk *glmS* geeni järgsesse neutraalsesse regiooni inserteerunud.

Teiseks kontrollisin *Pseudomonas*'e perekonna bakterite kromosoomi viidud testsüsteemi funktsionaalsust. Selleks külvasin kõik konjugatsiooni läbinud *Pseudomonas*'e tüved ja kontrolltüve *P. putida* PaW85 lac-lsc 10% sahharoosi minimaalsöötmetele, kuhu oli lisatud X-gal, IPTG ning Gm. Sellisel söötmel moodustasid testsüsteemiga rakud limased sinakad külvijooned ning need rakud, kuhu ei õnnestunud testsüsteemi sisestada jäid külvijooned valgeks (joonis 7).



Joonis 7. Illustratiivne pilt levaani tootvast *P. mendocina* PC1 lac-lsc testertüvest (joonisel märgitud numbrita 1; 2; 3; 4) ning kontrolltüvest *P. putida* PaW85 lac-lsc.

Lac-lsc testsüsteem õnnestus sisse viia 13-st CELMS kollektsiooni tüvest kaheksale *Pseudomonas*'ele:

- *Pseudomonas stutzeri* 2C63
- *Pseudomonas mendocina* PC1
- *Pseudomonas migulae* D67
- *Pseudomonas guinae* 2C3
- *Pseudomonas anguilliseptica* 2Bnah2
- *Pseudomonas corrugata* DSM 7228
- *Pseudomonas thivervalensis* N7
- *Pseudomonas aeruginosa* D10

Kõik ülaltoodud *Pseudomonas* perekonna tüved tootsid levaani ning värvusid siniselt kolme päeva jooksul. Ülejäänud tüvedesse (*Pseudomonas stutzeri* 2A20, *Pseudomonas mendocina* PC5, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70, *Pseudomonas fluorescens* PC24, *Pseudomonas putida* PC39) testsüsteemi sisestada ei õnnestunud ning katset peaks kordama. Aga kuna eesmärgiks oli testsüsteem sisestada pigem igasse erinevasse *Pseudomonas*'e liigi esindajasse, siis rohkem testsüsteemi sisestamist ei proovinud. Samuti oleks olnud huvitav testida *P. fluorescens*'i tüvel testsüsteemi toimimist, kuna www.pseudomonas.com andmebaasi järgi peaksid selle liigi bakteritel olema *lsc* geenid olemas. Sel konkreetsel tüvel (*P. fluorescens* PC24) pole need geenid funktsionaalsed, kuna 10% sahharoosi juuresolekul levaani ei toodetud.

2.3.4. Levaanipapillide teke *Pseudomonas*´e perekonna erinevatest liikidest konstrueeritud lac-lsc testertüvedel



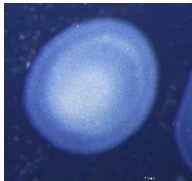
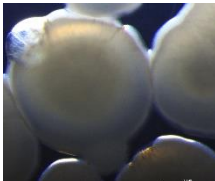
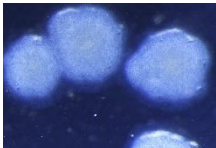
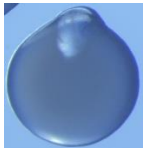

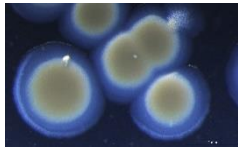
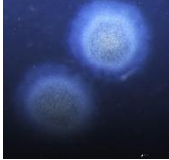

Kuna põhiline eesmärk selles töös on uurida testsüsteemi kasutatavust, siis hõlmab see endas testertüvede papillide moodustamist ja nende loendamist. Meie laboris on eelnevalt *P. putida* PaW85 papillide jälgimiseks paika pandud kindlad tingimused, mida rakendasime ka oma katse läbiviimisel. Selleks, et papillide teket jälgida, plaatsin kõik testsüsteemiga *Pseudomonas*´e tüved 10% sahharoosi LB tassidele, kuhu oli lisatud Gm. Inkubeerimisel tekkinud rakukolooniad loetlesin üle ning jälgisin luubiga papillide teket kolooniate pinnal kuue päeva jooksul. Selline ajavahemik valiti selle pärast, et pärast kuuendat päeva muutus papillide loendamine keeruliseks testsüsteemi nn. lekkimise tõttu. Testsüsteemi „lekkimine“ tähendab seda, et hoolimata LacI repressori olemasolust, toimub rakkudes mõningane *lsc-3* ja *lacZ* geenide transkriptsioon. Selle tõttu muutuvad kolooniad sahharoosi sisaldaval söötmel pikema aja vältel limaseks ning juurde lisanduvaid papille on raske eristada. Samuti selgus testsüsteemita ja testsüsteemiga bakterite kolooniate võrdlemisel, et testsüsteemi sisestamine muudab koloonia piirjooned teravamaks. Näiteks *P. aeruginosa* D10, *P. stutzeri* 2C63, *P. guinea* 2C3, *P. mendocina* PC1 ja *P. anguilliseptica* 2Bnah2 testsüsteemita tüvedel on kolooniate piirid hägusad, kuid vastavatel testertüvedel on kolooniate piirid konkreetsemad (tabel 1), mille põhjuseks võib olla testsüsteemi mõningane „lekkimine“ (tabel 1).

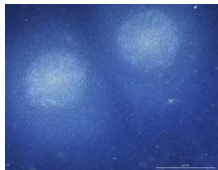
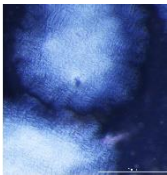
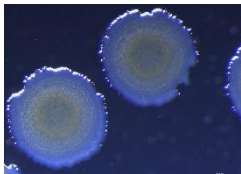

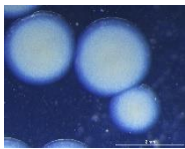

Papillide tekke jälgimisel ilmnes, et erinevatel *Pseudomonas*´e perekonna liikidel tekkisid esimesed papillid erinevatel aegadel. Teisel inkubeerimispäeval oli papillide teket märgata *P. anguilliseptica* 2Bnah2, *P. aeruginosa* D10, *P. stutzeri* 2C63 ja *P. corrugata* DSM 7228 lac-lsc testertüvedel. Oluliselt erinev papillide teke oli aga *P. aeruginosa* D10 testertüvel, kus juba teiseks päevaks tekkis kolooniate pinnale nii palju papille ja limaseid sektoreid, et loendamine muutus raskeks. Kolmandal loendamispäeval oli esmast papillide teket märgata *P. thivervalensis* N7, *P. migulae* D67 tüvedel. Märgatavalt hiljem tekkisid esimesed papillid *P. mendocina* PC1 ja *P. guinea* 2C3 tüvedel, kus esimeste papillide teket võis näha alles 5-ndal päeval. Üldiselt muutus seitsmendaks päevaks papillide loendamine keeruliseks pea kõikide tüvede puhul (va *P. mendocina* PC1 ja *P. guinea* 2C) testsüsteemi lekkimise tõttu.

Katsetulemustest oli näha, et testsüsteemi kasutamiseks teistes pseudomonaadides peaks iga bakteriliigi jaoks katsetingimusi optimeerima. Näiteks varieerima võib-olla nii söödet kui

sahharoosi kontsentratsiooni söötmes või paika panema papillide vaatlemiseks sobiva inkubeerimisperioodi pikkuse. Sellegi poolest sai katse eesmärk täidetud, kuna tõestasime ära kõikide testertüvede papillide tekke ning õnnestus näidata lac-lsc rakendatavust mutatsioonide jälgimiseks perekond *Pseudomonas* levaani mitte-tootvates liikides (tabel 1).

Tabel 1. *Pseudomonas* lac-lsc testertüvede (papilliga) kolooniate võrdlus algsete tüvede (ilma papillita) vastu

<i>Pseudomonas</i> 'e tüvi	Ilma papillita looduslik tüvi	Papilliga testertüvi
<i>P. aeruginosa</i> D10		
<i>P. stutzeri</i> 2C63		
<i>P. mendocina</i> PC1		
<i>P. migulae</i> D67		
<i>P. guinea</i> 2C3		

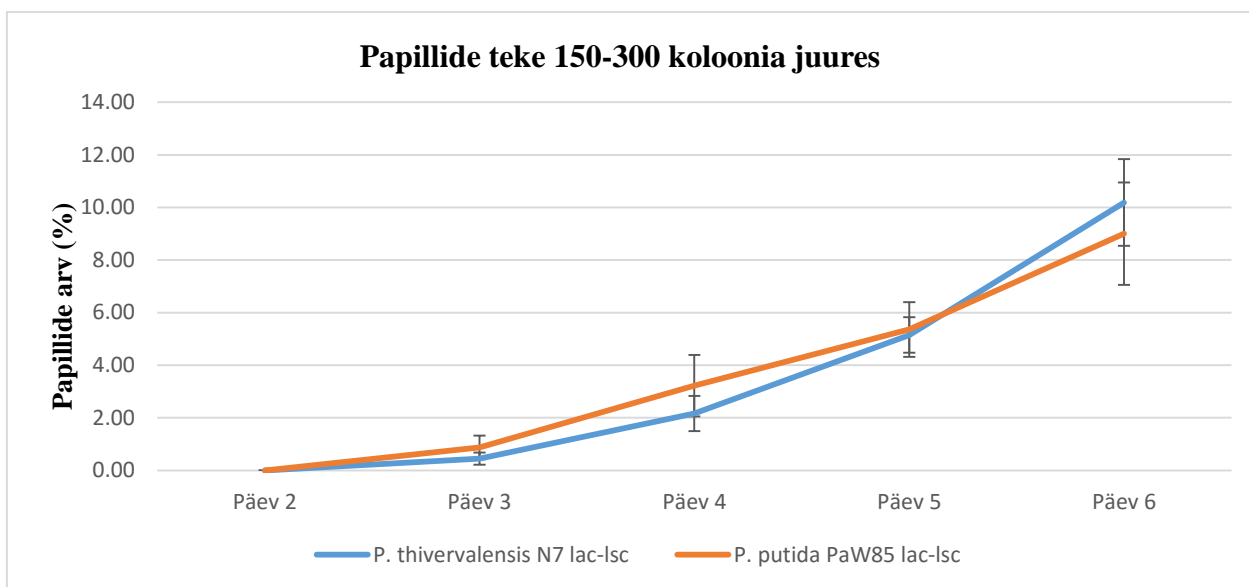
<i>P. anguilliseptica</i> 2Bnah2		
<i>P. corrugata</i> DSM 7228		
<i>P. thivervalensis</i> N7		

2.3.5. Levaanipapilli teket võimaldavate mutantide sageduse võrdlus *P. thivervalensis* N7 ja *P. putida* PaW85 lac-lsc testertüvedel

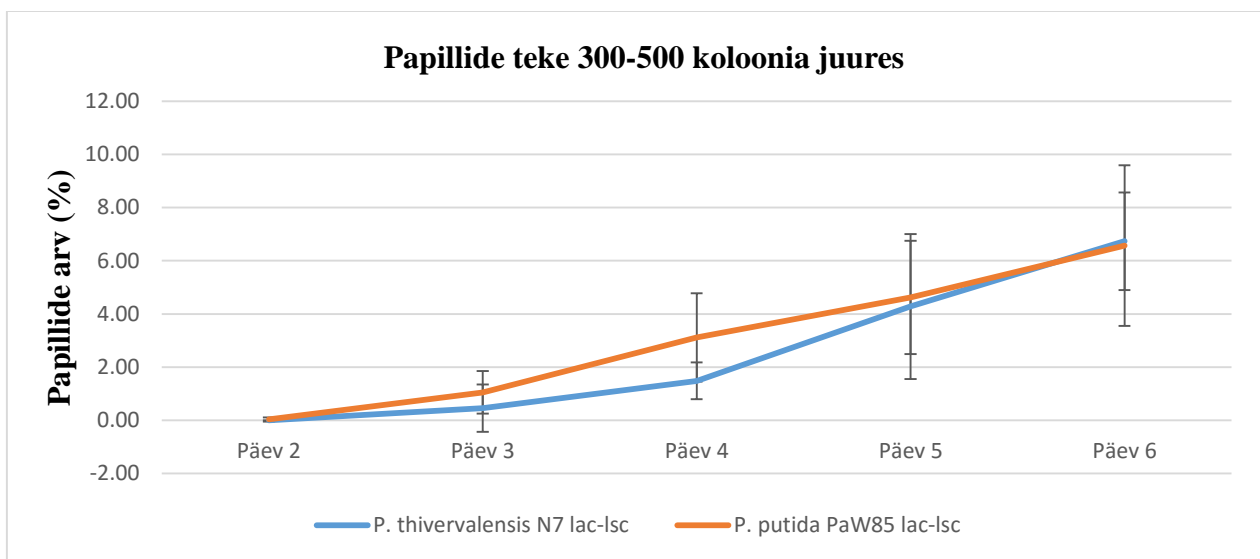
Eelnevalt on meie töögrupis *lacI* mutatsioonide tulemusel tekkivate levaanipapillide sagedust kirjeldatud *P. putida* PaW85 rakkudes (Tagel jt., 2016). Seetõttu otsustasin võrrelda ühe *Pseudomonas*'e testertüve papilli tekkesagedust *P. putida* PaW85 lac-lsc testertüvega. Võrdluseks valisin välja antud töös konstrueeritud *P. thivervalensis* N7 lac-lsc testertüve, mille levaanipapillid olid teiste testertüvedega võrreldes kõige paremini märgatavad ning seega oli nende tekkimist 6 inkubatsiooni päeva jooksul lihtne jälgida.

Teostasin kolm sõltumatut katset ning iga kord jälgisin *P. thivervalensis* N7 ja *P. putida* PaW85 lac-lsc testertüvede kolooniatel papillide moodustumist 6 päeva vältel. Olenevalt kolooniate arvust tassil jaotasin loendused kahte gruppi: tassid, kus oli 150-300 kolooniat ning tassid, kus oli 300-500 kolooniat. Kolooniate arvu põhjal jaotamine on oluline, sest mida vähem kolooniaid tassil, seda suuremaks saavad kolooniad kasvada ning selle tõttu on ka papillide teket parem märgata. Selle tulemusel saab vähemate kolooniatega tassidel loendada kokku rohkem papille kui rohkemate kolooniatega tassidel, mida on näha ka katsetes (joonis 8 ja joonis 9). Samuti mängib papillide

loendamisel rolli testsüsteemi lekkimine, kus nii nagu *P. putida* PaW85 lac-lsc puhul, täheldasin ka *P. thivervalensis* N7 lac-lsc kolooniate levaanisemaks muutumist pärast 6 inkubatsiooni päeva, mille tulemusel papillide loendamine muutus raskeks. Igal katsepäeval märkisin kolooniad, millele oli tekkinud levaanipapill ning katse lõpus arvutasin protsendi kui mitu kolooniat oli moodustanud papilli (joonis 8 ja joonis 9). Joonistel 8 ja 9 esitatud tulemustest on näha, et sõltumatult kolooniate arvust tassil, on papilliga kolooniate protsent *P. thivervalensis* N7 lac-lsc testertüves võrreldav *P. putida* PaW85 lac-lsc testertüvega. 150-300 kolooniaga tassidel moodustas 10% *P. thivervalensis* N7 lac-lsc-e kolooniatest ning 8,5 % *P. putida* PaW85 lac-lsc kolooniatest papilli (joonis 8). Ka tihedamatel tassidel (tassil 300-500 kolooniat) moodustasid mõlemad bakteritüved võrreldava hulga papille, mõlemal juhul 6,5% kolooniatest (joonis 9). Sellest võrdlusest võib järeldada, et *P. thivervalensis* N7 lac-lsc tüvel on LacI-d inaktiveerinud mutatsioonide saegsus võrreldav *P. putida* PaW85 lac-lsc testertüvega.



Joonis 8. Papillide tekke protsentuaalne arv 6 päeva jooksul *P. thivervalensis* N7 lac-lsc ja *P. putida* PaW85 lac-lsc testertüvedel. Tulemused saadud kolme sõltumatu katse põhjal.



Joonis 9. Papillide teke protsentuaalne arv 6 päeva jooksul *P. thivervalensis* N7 lac-lsc ja *P. putida* PaW85 lac-lsc testertüvedel. Tulemused saadud kolme sõltumatu katse põhjal.

Kokkuvõte

Mutatsioonid on evolutsiooni edasiviivaks jõuks. Mutatsioonid võivad tekkida nii erinevate rakuväliste või raku elutegevuse käigus tekkinud DNA-d kahjustavate mutageenide toimel kui ka replikatsioonivigade parandamata jätmisest. Suur osa mutatsioone on kahjulikud ja mõnikord isegi üksainus mutatsioon võib olla rakule letaalne. Samas ei pruugi mutatsioonid alati kahjulikud olla ning võivad hoopis teatud tingimustel kasulikuks osutuda. Mutatsioonimehhanismide paremaks mõistmiseks on mikroorganismidele loodud arvukalt meetodeid, mis aitavad mutatsioone ja mutatsioonisagedust uurida kaudselt.

Meie laboris uuritakse mutatsioonide tekkemehhanisme bakteris *Pseudomonas putida* PaW85. Hiljuti konstrueeriti uudne levaanipapillide tekkel põhinev lac-lsc testsüsteem, mis võimaldab bakterikoloonia erinevatel kasvuetappidel jälgida mutatsioonide tekkimist ning mille abil saab otsida uusi mutatsioonisagedust mõjutavaid geene. Selle testsüsteemi kasutatavust on hetkel näidatud ainult laboritüves *P. putida* PaW85 ning sellest lähtuvalt tekkis küsimus, et kas vastavat testsüsteemi on võimalik kasutada ka teistes *Pseudomonas*'e liikides. Töö eesmärgi saavutamiseks valiti katsetesse looduslike ja laboratoorsete mikroobitüvede kollektsioonist CELMS erinevad pseudomonaadid ning viidi nende genoomi lac-lsc testsüsteem.

Töö tulemused võib kokku võtta järgnevalt:

1. Bakteriperekond *Pseudomonas* kaheksast erinevast liigist konstrueerisin lac-lsc testertüved
2. Näitasin ära lac-lsc testsüsteemi rakendatavuse perekond *Pseudomonas* erinevat liiki testertüvedel
3. *P. putida* PaW85 lac-lsc ja *P. thivervalensis* N7 lac-lsc testertüvedel on papillide tekkesagedus omavahel võrreldav

Summary

Mutations are the driving force of evolution. Mutations can occur in many different ways, for example by exposure to mutagenic chemicals or radioactive rays or just due to errors in DNA synthesis. These changes in genetic material can create a wide genetic variation but mutations can also be very destructive. Even a single mutation can lead to fatal consequences. To counteract these problems organisms use different DNA repair mechanisms to maintain their genetic integrity.

Many assays have been developed for bacteria to understand their mutational pathways, to evaluate their mutation frequencies and to discover new genes that are associated with rises in mutation frequencies. For a long time, *Escherichia coli* has been the dominant microorganism in laboratory studies. Because of this, most of the assays have been developed for this species. But not all *E. coli* assays are applicable in other bacterial species.

In our laboratory, a new papillation assay has been developed to study mutational pathways in *Pseudomonas* family. Until now, the use of this papillation assay has been only proven in *P. putida* PaW 85 laboratory strain. This assay has allowed to test mutation frequency and find new genes connected to rises in mutation frequency in respective *P. putida* strain by producing extracellular polymer levan and forming papillae on the surface of their colonies (Tagel jt., 2016). Since *Pseudomonas* family has a very wide economic distribution, we wanted to see if this assay can be used in other naturally occurring *Pseudomonas* bacteria as well.

To accomplish this goal I tested the use of this assay in 13 different *Pseudomonas* family strains and the results of this study can be summarized as follows:

- I managed to construct 8 lac-lsc *Pseudomonas* tester strains
- I showed that this assay can be used in other *Pseudomonas* family tester strains
- The formation of papillae in *P. putida* PaW85 lac-lsc and *P. thivervalensis* N7 lac-lsc tester strains are comparable

KASUTATUD KIRJANDUS

Adams, M. H. (1959). "Bacteriophages." Bacteriophages.

Alamäe, T., T. Visnapuu, K. Mardo, A. Mäe & A. D. Zamfir (2012). Levansucrases of *Pseudomonas* bacteria: novel approaches for protein expression, assay of enzymes, fructooligosaccharides and heterooligofructans, Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK.

Bao, Y., D. P. Lies, H. Fu & G. P. Roberts (1991). "An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria." Gene **109**(1): 167-168.

Batty, D. P. & R. D. Wood (2000). "Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA." Gene **241**(2): 193-204.

Bayley, S. A., C. J. Duggleby, M. J. Worsey, P. A. Williams, K. G. Hardy & P. Broda (1977). "Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2." Molecular and General Genetics MGG **154**(2): 203-204.

Bloom, L. B., X. Chen, D. K. Fygenon, J. Turner, M. O'Donnell & M. F. Goodman (1997). "Fidelity of *Escherichia coli* DNA Polymerase III Holoenzyme THE EFFECTS OF β , γ COMPLEX PROCESSIVITY PROTEINS AND ϵ PROOFREADING EXONUCLEASE ON NUCLEOTIDE MISINCORPORATION EFFICIENCIES." Journal of Biological Chemistry **272**(44): 27919-27930.

Boyer, H. W. & D. Roulland-dussoix (1969). "A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*." Journal of molecular biology **41**(3): 459-472.

Bridges, B. A. (2001). "Hypermuation in bacteria and other cellular systems." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1405): 29-39.

Campbell, E. A., N. Korzheva, A. Mustaev, K. Murakami, S. Nair, A. Goldfarb & S. A. Darst (2001). "Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase." Cell **104**(6): 901-912.

Caulfield, J. L., J. S. Wishnok & S. R. Tannenbaum (1998). "Nitric oxide-induced deamination of cytosine and guanine in deoxynucleosides and oligonucleotides." J Biol Chem **273**(21): 12689-12695.

Court, D. L., J. A. Sawitzke & L. C. Thomason (2002). "Genetic engineering using homologous recombination." Annu Rev Genet **36**: 361-388.

Cox, M. M., M. F. Goodman, K. N. Kreuzer, D. J. Sherratt, S. J. Sandler & K. J. Mariani (2000). "The importance of repairing stalled replication forks." Nature **404**(6773): 37-41.

Cupples, C. G. & J. H. Miller (1989). "A set of lacZ mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of the six base substitutions." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(14): 5345-5349.

De Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik & K. N. Timmis (1990). "Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria." Journal of bacteriology **172**(11): 6568-6572.

- Echols, H., C. Lu & P. Burgers (1983). "Mutator strains of *Escherichia coli*, mutD and dnaQ, with defective exonucleolytic editing by DNA polymerase III holoenzyme." Proceedings of the National Academy of Sciences **80**(8): 2189-2192.
- Figurski, D. H. & D. R. Helinski (1979). "Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans." Proceedings of the National Academy of Sciences **76**(4): 1648-1652.
- Foster, P. L. (2007). "Stress-induced mutagenesis in bacteria." Crit Rev Biochem Mol Biol **42**(5): 373-397.
- Harfe, B. D. & S. Jinks-Robertson (2000). "DNA mismatch repair and genetic instability." Annu Rev Genet **34**(1): 359-399.
- Jatsenko, T., A. Tover, R. Tegova & M. Kivisaar (2010). "Molecular characterization of Rif^r mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **683**(1): 106-114.
- Juurik, T., H. Ilves, R. Teras, T. Ilmjärv, K. Tavita, K. Ukkivi, A. Teppo, K. Mikkil & M. Kivisaar (2012). "Mutation frequency and spectrum of mutations vary at different chromosomal positions of *Pseudomonas putida*." PLoS One **7**(10): e48511.
- Kamiya, H. (2003). "Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides SURVEY AND SUMMARY." Nucleic Acids Research **31**(2): 517-531.
- Kasak, L., R. Horak & M. Kivisaar (1997). "Promoter-creating mutations in *Pseudomonas putida*: a model system for the study of mutation in starving bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3134-3139.
- Kivisaar, M. (2010). "Mechanisms of stationary-phase mutagenesis in bacteria: mutational processes in pseudomonads." FEMS Microbiol Lett **312**(1): 1-14.
- Koch, B., L. E. Jensen & O. Nybroe (2001). "A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site." J Microbiol Methods **45**(3): 187-195.
- Krwawicz, J., K. D. Arczewska, E. Speina, A. Maciejewska & E. Grzesiuk (2007). "Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease." Acta Biochim Pol **54**(3): 413-434.
- Lusetti, S. L. & M. M. Cox (2002). "The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks." Annu Rev Biochem **71**: 71-100.
- Messner, K. R. & J. A. Imlay (2002). "Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase." J Biol Chem **277**(45): 42563-42571.
- Michaels, M. L. & J. H. Miller (1992). "The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine)." J Bacteriol **174**(20): 6321-6325.
- Miller, J. H. (1972). "Experiments in molecular genetics."

- Miller, J. H. (1996). "Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair." Annu Rev Microbiol **50**: 625-643.
- Nowosielska, A. (2007). "Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 5. The role of recombination in DNA repair and genome stability." Acta Biochim Pol **54**(3): 483-494.
- Ohta, T., S.-i. Tokishita, R. Tsunoi, S. Ohmae & H. Yamagata (2002). "Characterization of Trp+ reversions in Escherichia coli strain WP2uvrA." Mutagenesis **17**(4): 313-316.
- Peix, A., M. H. Ramirez-Bahena & E. Velazquez (2009). "Historical evolution and current status of the taxonomy of genus Pseudomonas." Infect Genet Evol **9**(6): 1132-1147.
- Rocha, E. P., E. Cornet & B. Michel (2005). "Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems." PLoS Genet **1**(2): e15.
- Rosche, W. A. & P. L. Foster (2000). "Determining mutation rates in bacterial populations." Methods **20**(1): 4-17.
- Rosenberg, S. M., C. Shee, R. L. Frisch & P. J. Hastings (2012). "Stress-induced mutation via DNA breaks in Escherichia coli: a molecular mechanism with implications for evolution and medicine." Bioessays **34**(10): 885-892.
- Saumaa, S., A. Tover, L. Kasak & M. Kivisaar (2002). "Different spectra of stationary-phase mutations in early-arising versus late-arising mutants of Pseudomonas putida: involvement of the DNA repair enzyme MutY and the stationary-phase sigma factor RpoS." Journal of bacteriology **184**(24): 6957-6965.
- Shrivastav, N., D. Li & J. M. Essigmann (2010). "Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation." Carcinogenesis **31**(1): 59-70.
- Sledziewska-Gojska, E., E. Grzesiuk, A. Plachta & C. Janion (1992). "Mutagenesis of Escherichia coli: a method for determining mutagenic specificity by analysis of tRNA suppressors." Mutagenesis **7**(1): 41-46.
- Sniegowski, P. D., P. J. Gerrish, T. Johnson & A. Shaver (2000). "The evolution of mutation rates: separating causes from consequences." Bioessays **22**(12): 1057-1066.
- Tagel, M., H. Ilves, K. Tavita, R. Hõrak & M. Kivisaar (2016). "Identification of new mutation rate affecting genes in Pseudomonas putida by a novel papillation assay." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis (saadetud avaldamiseks).
- Tegova, R., A. Tover, K. Tarassova, M. Tark & M. Kivisaar (2004). "Involvement of error-prone DNA polymerase IV in stationary-phase mutagenesis in Pseudomonas putida." Journal of bacteriology **186**(9): 2735-2744.
- Tomasz, M. (1995). "Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective)." Chem Biol **2**(9): 575-579.
- Truglio, J. J., D. L. Croteau, B. Van Houten & C. Kisker (2006). "Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system." Chem Rev **106**(2): 233-252.
- Van Houten, B. (1990). "Nucleotide excision repair in Escherichia coli." Microbiol Rev **54**(1): 18-51.
- Visnapuu, T., A. Mäe & T. Alamäe (2008). "Hansenula polymorpha maltase gene promoter with sigma 70-like elements is feasible for Escherichia coli-based biotechnological applications:

Expression of three genomic levansucrase genes of *Pseudomonas syringae* pv. tomato." Process Biochemistry **43**(4): 414-422.

Wade, J. T., N. B. Reppas, G. M. Church & K. Struhl (2005). "Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites." Genes & development **19**(21): 2619-2630.

Williams, A. B. & P. L. Foster (2012). "Stress-Induced Mutagenesis." EcoSal Plus **5**(1).

Winsor, G. L., D. K. Lam, L. Fleming, R. Lo, M. D. Whiteside, Y. Y. Nancy, R. E. Hancock & F. S. Brinkman (2011). "Pseudomonas Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes." Nucleic Acids Research **39**(suppl 1): D596-D600.

Witkin, E. M. (1976). "Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*." Bacteriol Rev **40**(4): 869-907.

Wood, M. L., M. Dizdaroglu, E. Gajewski & J. M. Essigmann (1990). "Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome." Biochemistry **29**(30): 7024-7032.

Yang, H., C. Sikavi, K. Tran, S. M. McGillivray, V. Nizet, M. Yung, A. Chang & J. H. Miller (2011). "Papillation in *Bacillus anthracis* colonies: a tool for finding new mutators." Molecular microbiology **79**(5): 1276-1293.

Kasutatud veebilehed

- <http://www.pseudomonas.com/>

LISAD

Lisa 1. Töös kasutatud bakterid ja plasmiidid

Bakteritüvi	Iseloomustus	Allikas
<i>Pseudomonas</i> 'e kollektsioonist	tüved CELMS-i	CELMS-i nr.
<i>P. stutzeri</i> 2A20	Eraldatud Läänemere pinnaveest, Tallinna lahest	CELMS EEUT 2A20
<i>P. stutzeri</i> 2C63	Eraldatud Läänemere pinnaveest, Narva lahest	CELMS EEUT 2C63
2C63 lac-lsc	<i>P. stutzeri</i> 2C63 <i>lacI</i> -P _{tac} - <i>lsc</i> -3 <i>lacZ</i> (Gm ^f) geenikassetti sisaldav tüvi	Käesolev töö
<i>P. mendocina</i> PC1	Eraldatud Kohtla järvest	CELMS EEUT PC1
PC1 lac-lsc	<i>P. mendocina</i> PC1 <i>lacI</i> -P _{tac} - <i>lsc</i> -3 <i>lacZ</i> (Gm ^f) geenikassetti sisaldav tüvi	Käesolev töö
<i>P. mendocina</i> PC5	Eraldatud Kohtla-Järve põlevkivi tahkete jäätmete prügila heitvee kanalist	CELMS EEUT PC5
<i>P. pseudo-alcaligenes</i> C70	Eraldatud Läänemere pinnaveest, Narva lahest	CELMS EEUT C70
<i>P. migulae</i> D67	Eraldatud Läänemere pinnaveest, Riia lahest	CELMS EEUT D67

D67 lac-lsc	<i>P. migulae</i> D67 <i>lacI-P_{tac}-lsc-3lacZ</i> (Gm ^r) geenikassetti sisaldav tüvi	Käesolev töö
<i>P. guinae</i> 2C3	Eraldatud Läänemere pinnaveest, Narva lahest	CELMS EEUT 2C3
2C3 lac-lsc	<i>P. guinae</i> 2C3 <i>lacI-P_{tac}-lsc-3lacZ</i> (Gm ^r) geenikassetti sisaldav tüvi	Käesolev töö
<i>P. anguilliseptica</i> 2Bnah2	Eraldatud Läänemere pinnaveest, Soome lahest	CELMS EEUT 2Bnah2
2Bnah2 lac-lsc	<i>P. anguilliseptica</i> 2Bnah2 <i>lacI-P_{tac}-lsc-3lacZ</i> (Gm ^r) geenikassetti sisaldav tüvi	Käesolev töö
<i>P. corrugata</i> DSM 7228	Pärit DSMZ mikroobikollektsioonist. Isoleeritud <i>Lycopersicon esculentum</i> 'ist	EEUT 7228
DSM7228 lac-lsc	<i>P. corrugata</i> DSM-7228 <i>lacI-P_{tac}-lsc-3lacZ</i> (Gm ^r) geenikassetti sisaldav tüvi	Käesolev töö
<i>P. fluorescens</i> PC24	Eraldatud Kohtla-Järve põlevkivi tahkete jätmete prügila heitvee kanalist	CELMS EEUT PC24
<i>P. putida</i> PC39	Eraldatud Purtse jõest	CELMS EEUT PC39
<i>P. thivervalensis</i> N7	Eraldatud mullapinnasest	CELMS EEUT N7

N7 lac-lsc	<i>P. thivervalensis</i> N7 <i>lacI</i> -P _{tac} - <i>lsc</i> -3 <i>lacZ</i> (Gm ^r) geenikassetti sisaldav tüvi	Käesolev töö
<i>P. aeruginosa</i> D10	Eraldatud Läänemere pinnaveest, Riia lahest	CELMS EEUT D10
D10 lac-lsc	<i>P. aeruginosa</i> D10 <i>lacI</i> -P _{tac} - <i>lsc</i> -3 <i>lacZ</i> (Gm ^r) geenikassetti sisaldav tüvi	Käesolev töö
<i>Pseudomonas</i>		
<i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i> pv. Tomato DC 3000	(Visnapuu jt., 2008)
<i>P. putida</i> PaW85	Algne tüvi, isogeenne täielikultsekveneeritud <i>P. putida</i> KT2440 tüvega	(Bayley jt., 1977)
PaW85 lac-lsc	<i>P. putida</i> PaW85 <i>lacI</i> -P _{tac} - <i>lsc</i> -3 <i>lacZ</i> (Gm ^r) geenikassetti sisaldav tüvi	(Tagel jt., 2016)
<i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> CC118λpir	Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rspE rpo B argE (Apm)	(De Lorenzo jt., 1990)
<i>E. coli</i> HB101	subE44 subF58 hsdS3 (rB-mB-) recA13proΔ2 lacY1 galK2 rsp20 xyl-5 mt1 -1	(Boyer ja Roulland- dussoix, 1969)
Plasmiid		

pBKTn7Gm/ <i>lsc-3lacZ</i>	pBK-miniTn7- Ω Gm, mini-Tn7 (Ap ^r , Gm ^r) inverteeritud järjestuste vahel paikneb <i>lacI</i> - P _{tac} - <i>lsc-3lacZ</i> geenikassett	(Tagel jt., 2016)
pUX-BF13	Tn7 transposaasi valke kodeeriv helperplasmiid (Ap ^r)	(Bao jt., 1991)
pRK2013	Konjugatsiooni soodustav helperplasmiid (Km ^r)	(Figurski ja Helinski, 1979)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina; Gabriel Agur
(sünnikuupäev: 24.02.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Papillide tekkel põhineva testsüsteemi kasutatavus perekond Pseudomonas bakterites,

mille juhendajad on Heili Ilves, Ph.D. ja Mari Tagel, MSc
- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil,
sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse
tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas
digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016